

C. Welsh - Becker

Bochum 1973

DNA- und RNA-Puffs von *Sciara coprophila*

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der

Naturwissenschaften

der Abteilung für Biologie

der Ruhr-Universität Bochum

von

Cornelia Welsch geb. Becker

aus

Bleicherode / Harz

Bochum 1973



Dissertation eingereicht am: 6. 2. 73

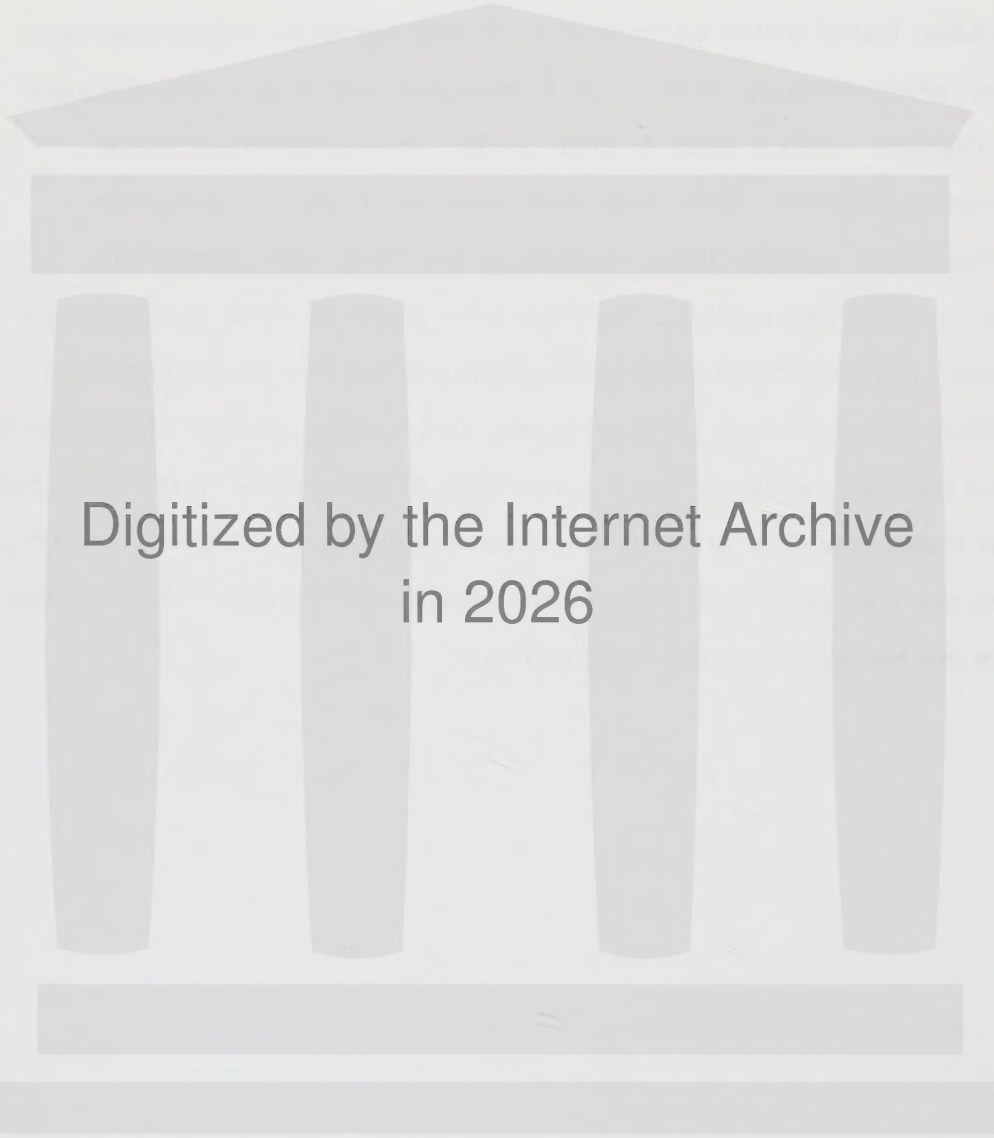
Tag der mündlichen Prüfung: 29. 3. 73

Referent: Prof. Dr. H.-G. Keyl

Korreferent: Prof. Dr. W. Traut

Abstract.

Ultrastructure of DNA and RNA puffs has been studied in salivary gland chromosomes of 4th instar larvae of Sciara coprophila. On the uncoiled DNP fibrils in RNA puffs granules of $200 - 350 \text{ \AA}$ in diameter have been found which consist of RNP and are to be interpreted as a transcription product. $400 - 600 \text{ \AA}$ granules, which are less frequent than the $200 - 350 \text{ \AA}$ ones in RNA puffs, could shown not to be attacked by RNase. Obviously they consist of DNP. - Looplike structures are seen in the periphery of the DNA puffs during the phase of extra replication. They are also found at other chromosome regions. It is conceivable that these structures are connected with the DNA replication at those regions. The number of $400 - 600 \text{ \AA}$ granules on the fibrils is enlarged by the increase of extra DNA in the DNA puffs. Often these granules are combined to complexes of $1000 \text{ \AA}$ diameter, which are like pearls on a chain arranged on the fibrils. RNP synthesis could not be proved in the DNA puffs.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546611_0034

I. Einleitung

In den Speicheldrüsenchromosomen von *Sciara coprophila* und verwandten Arten finden zwischen normalen Polytänisierungsschritten DNA-Replikationen statt, die nur auf bestimmte Abschnitte des Chromosoms beschränkt sind. Diese Extra-Replikationen sind gewöhnlich mit einem puffing verbunden. Durch die lokale DNA-Zunahme wird das DNA-Verteilungsmuster auf den Chromosomen sichtbar und messbar verändert. Diese sog. DNA-Puffs wurden bisher auch an polytänen Chromosomen der Spezies *Sciara ocellaris* (Pavan, 1959; Gabrusewycz-Garcia, 1964; Crouse, 1968; Rasch, 1970) *Sciara pauciseta* (Gabrusewycz-Garcia, 1971) *Rhynchosciara angelae* (Breuer und Pavan u.a. seit 1955), *Hybosciara fragilis* (Pavan und Cunha, 1969), *Bradysia mogiensis* (Sauaia, 1971) festgestellt. Cytophotometrische (Crouse und Keyl, 1968; Rasch, 1970) und autoradiographische (Gabrusewycz-Garcia, 1964) Untersuchungen ergaben, daß die lokalisierte DNA-Zunahme in den Riesenchromosomen ausschließlich in der Endphase der Larvenentwicklung (d.h. im 4. Larvenstadium) auftritt.

Ein bisher nicht näher untersuchtes Problem betrifft die morphologischen Veränderungen an den Chromosomenfibrillen während der Extra-Replikationen und des puffing. Dabei stellt sich auch die Frage, wie die Extra-DNA in die bereits vorhandenen Strukturen integriert wird. Nach den bisherigen Untersuchungen von Crouse und Keyl (1968) und Rasch (1970) muß als gesichert angesehen werden, daß die Extra-DNA keine metabolische DNA ist, d.h., daß sie die Chromosomen nicht verläßt, um im Cytoplasma als Matrize für zusätzliche RNA-Synthesen zu dienen. In diesem Zusammenhang wurden bereits mögliche Korrelationen zwischen physiologischen Zuständen in den Sciariden-Larven unter gleichzeitiger Bildung von Extra-DNA in bestimmten Chromosomenbereichen von Crouse (1968), Pavan (1969) und Sauaia (1971) diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit wird der Versuch unternommen, mit Hilfe spezieller licht- und elektronenmikroskopischer Untersuchungsmethoden die während der Extra-Replikationen und des puffings auftretenden Struk-

turveränderungen zu interpretieren. Außerdem wird ein Modell für den allgemeinen Ablauf von regulären und Extra-Replikationen entwickelt und mit den bisher bekannten cytologischen Befunden an *Sciara* diskutiert.

II. Material und Methode

Als Untersuchungsmaterial wurden weibliche Larven von *Sciara coprophila* * verwendet, da diese wegen eines zusätzlichen Replikationsschrittes größere Speicheldrüsenchromosomen besitzen als männliche Larven (Rasch, 1970). Bei *Sciara coprophila* läßt sich das 4. Larvenstadium, in dem die DNA-Extra-Replikationen stattfinden, nach Lage und Größe der Augenflecke in 5 Stufen einteilen. Dies sind die Stufen a - e in den Chromosomenkarten von Gabrusewycz-Garcia (1964).

Die Speicheldrüsen weiblicher Larven aller 5 Stufen des 4. Stadiums wurden in Ringerlösung nach Ephrussi-Beadle präpariert und anschließend in Glutaraldehyd-Phosphatpuffer fixiert. Das Fixierungsmittel wurde aus 0,2 Mol Phosphatpuffer pH 7,3, Aqua dest. und Glutaraldehyd im Verhältnis 2:1:1 vor jeder Präparation frisch hergestellt. Nach 5-minütiger Fixierung wurden die Speicheldrüsen auf gelatinisierte Objektträger übertragen und dort in 50 %iger Essigsäure gequetscht. Diese Präparationsschritte wurden auf einem Tisch bei $0^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{ C}$ durchgeführt. Nach Entfernung der Deckgläser durch Vereisen erfolgte eine Nachfixierung von 30 Min. Dauer in einem Gemisch von Äthanol und Formol (9:1) bei 0° C . Durch eine Äthanolreihe wurden die Präparate in Aqua dest. überführt, anschließend 5 Min. in Hämalaun gefärbt und 30 Min. in 1 %iger wäßriger Uranylacetatlösung für die Elektronenmikroskopie kontrastiert. In 50 %igem Äthanol wurden die Quetschpräparate mit dem Photomikroskop

* Frau Prof. Dr. H. Crouse (Institut of Molecular Biophysics, Tallahassee, USA) hat den Stamm in dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt.

auf ihre Brauchbarkeit für die Elektronenmikroskopie untersucht. Die entwässerten Präparate wurden zweimal 15 Min. in reinem Aceton auf die Einbettung in Araldit vorbereitet (Ruthmann, 1966). Nach Polymerisierung des Araldits wurden die geeigneten Stellen jedes Präparats mit dem LKB-Pyramitom angespitzt und mit einem LKB-Ultratom geschnitten. Die zwischen 600 und 1500 Å dicken Schnitte wurden auf den Kupfernetzen mit 2 %igem Uranylacetat nachkontrastiert. Alle elektronenmikroskopischen Arbeiten wurden am Siemens-Elmiskop 101 bei 40 oder 60 kV durchgeführt.

Zum RNA-, DNA- und Proteinnachweis wurden an Quetschpräparaten im Anschluß an die Nachfixierung folgende Behandlungen durchgeführt:

- a. 45 Min. in einer Lösung von 1 mg RNase/ml Phosphatpuffer pH 6,5 bei 30° C oder 37° C. Waschen in kalter Trichloressigsäure, Färben mit Hämalan und Weiterbehandlung wie oben beschrieben.
- b. 45 Min. in einer Lösung von 1 mg DNase/ml Phosphatpuffer pH 6,6 (0,7 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /mg DNase) bei 37° C. Nachbehandlung wie bei a.
- c. 15 oder 30 Min. in einer Lösung von 0,2 mg Pronase P/ml Phosphatpuffer pH 6,8 bei 20° C. Nachbehandlung wie bei a.

Für die Autoradiographien wurden die Speicheldrüsen in Ephrussi-Beadle-Ringer präpariert und danach bei 20 - 23° C in einer Lösung aus Uridin-5-³H und Phosphatpuffer pH 7,2 inkubiert. Die spezifische Aktivität der Lösung betrug 20 Ci/mmol oder 29 Ci/mmol. Die Inkubationsdauer variierte zwischen 10 und 40 Min. (genaue Daten s. Abbildungslegenden). Danach wurden die Speicheldrüsen in einem Gemisch aus Äthanol, Glutaraldehyd und Eisessig (6:3:1) 5 Min. lang fixiert. Nach Quetschen, Vereisen und Nachfixieren in Alkohol-Formol wurden die Präparate 40 Min. in Orcein-Essigsäure gefärbt, in Aqua dest. überführt und mit Kodak stripping film AR 10 überzogen. Die Expositionsdauer betrug 8, 12 oder 16 Tage bei 4° C. Die Weiterbehandlung erfolgte wie bei Hägele (1970).

Der Nachweis saurer Puff-Proteine mit Feulgen-Fastgreen-Färbung erfolgte nach der von Walter (1973) angegebenen Methode.

III. Resultate

Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden folgende Abschnitte des larvalen Speicheldrüsenchromosomensatzes von *Sciara coprophila* herangezogen:

DNA-Puffs an den Chromosomenabschnitten II 2 B, III 2 B und II 9 A,

RNA-Puffs an den Chromosomenabschnitten II 10 B, III 12 A und III 15 B.

Die Angabe der Chromosomenabschnitte und der chromosomalen Entwicklungsstufen a - e im 4. Larvenstadium folgt der Chromosomenkarte von Gabrusewycz-Garcia (1964).

Die Bezeichnung RNA-Puff wird für Chromosomenabschnitte angewendet, an denen außer der durch normale Replikationsschritte produzierten DNA nur Ribonucleoprotein (RNP) gebildet wird. Dagegen findet in DNA-Puffs außer normalen DNA-Replikationen und RNA-Synthesen eine Bildung von Extra-DNA statt.

a. Struktur der RNA-Puffs

Die RNA-Puffs in den angegebenen Chromosomenabschnitten sind auf Stufe b des 4. Larvenstadiums noch nicht vollständig ausgebildet, d.h. der Bandencharakter ist in den puffenden Regionen noch nicht völlig verlorengegangen und die DNP-Strukturen sind erst wenig aufgelockert. Aus diesem Grunde gelingt es in diesem Entwicklungsstadium noch nicht, genauere Angaben über strukturelle Einzelheiten zu machen.

Auf Stufe c dagegen wird der maximale Ausdehnungsgrad in der Puffentwicklung erreicht; dieser Zustand bleibt bis zum Ende des 4. Larvenstadiums, also bis zur Ausbildung der Vorpuppe weitgehend erhalten. Im Elektronenmikroskop erweist sich, daß ein voll entwickelter RNA-Puff aus fibrillären und granulären Strukturen aufgebaut ist (Abb. 1 und 2). Die Fibrillen verlaufen je nach dem Quetschungsgrad des Präparats mehr oder weniger parallel zur Chromosomenachse; dabei sind sie innerhalb des Puffs über längere Strecken zu verfolgen. Die Puff-Fibrillen haben überwiegend einen Durchmesser von $100 - 200 \overset{0}{\text{\AA}}$, seltener $400 - 500 \overset{0}{\text{\AA}}$ (Abb. 2). Die Schwankungen im Durchmesser dürften durch unterschied-

lichen Auffaltungsgrad der Fibrille zustande kommen. Es ist deshalb möglich, daß eine $250 \text{ \AA}$ -Fibrille durch Schraubung einer dünneren Fibrille von z.B. $100 \text{ \AA}$ entsteht und während ihres Verlaufs durch Dehnung oder teilweise Entfaltung ihren Durchmesser ändert (Abb. 2). Außerdem kann die Fibrillendicke auch durch unregelmäßige Anlagerung von Puffmaterial (z.B. sauren Puff-Proteinen, RNP) beeinflußt werden. Die höheren Durchmesserwerte, besonders diejenigen in $400\text{--}500 \text{ \AA}$ -Bereich, dürften vorwiegend auf Aggregationen dünnerer Einheiten zurückgehen (Abb. 2, s. auch die Abb. 3 und 4 nach Enzymbehandlung)

An den Fibrillen der RNA-Puffs aller Entwicklungsstadien sind granuläre Strukturen in unregelmäßiger Anordnung sichtbar. Als Granula werden kompakte Strukturen bezeichnet, die sich deutlich von ihrem möglichen Entstehungsort, den Fibrillen, abheben und nicht jene Gebilde, die infolge Überkreuzung mehrerer Fibrillen zustande kommen und dadurch besonders elektronendicht erscheinen. Die meisten Granula haben Durchmesser zwischen 200 und $350 \text{ \AA}$. Viel seltener sind granuläre Strukturen im Größenbereich von $400\text{--}600 \text{ \AA}$ vorhanden (Abb. 2). Diese zuletzt genannten Granula sind selten aus kleineren Körnchen zusammengesetzt, sondern ähneln in ihrem Aufbau den $200\text{--}350 \text{ \AA}$ -großen Granula. Sie sind besonders gut in Präparaten sichtbar, die einer RNase-Behandlung unterworfen wurden (Abb. 4) und zeigen - wie die $200\text{--}350 \text{ \AA}$ -Granula - eine aufgeknäuelte Struktur, die durch Auffaltung bzw. enge Schraubung von dünnerem fibrillärem Material zustande zu kommen scheint (Abb. 2, 4). Die Granula aller genannten Größenordnungen können den Puff-Längsfibrillen eng anliegen, aber auch einzeln oder gruppenweise um diese angeordnet sein (Abb. 1, 2, 3). Dabei ist nicht immer ein fibrillärer Kontakt zwischen den Granula und Puff-Fibrillen erkennbar.

Bei der Behandlung der Chromosomen mit RNase (30 Min. bei 37°C) verringert sich die Anzahl der $200\text{--}350 \text{ \AA}$ großen Granula erheblich (Abb. 4). Die prozentualen Angaben über den Granula-Verlust in den RNA-Puffs nach RNase-Einwirkung wurden durch mehrfache Granula-

Zählungen an bestimmten RNA-Puff-Abschnitten mit und ohne RNase-Behandlung erhalten (siehe Tabelle 1). Die Granula-Zählungen am RNA-Puff III 12 A erfolgten ausschließlich an dessen Teilen I und III.

Die in den RNA-Puffs außer den $200 - 350 \text{ \AA}$ großen Granula vorhandenen Körnchenstrukturen mit Durchmesserwerten zwischen 400 und $600 \text{ \AA}$ werden durch die RNase-Behandlung offenbar nicht angegriffen, denn ihre Anzahl und Struktur ist nach der Enzymbehandlung nicht merklich verändert. Während die nach der RNase-Behandlung verschwundenen $200 - 350 \text{ \AA}$ großen Körnchen den am Puffort entstehenden RNP-Partikeln zuzurechnen sind, können die verbleibenden Granula entweder als nicht entspiralisiertes DNP oder als reine Proteinstrukturen aufgefaßt werden.

Lichtmikroskopische Präparate zeigen nach einer Färbung mit Fastgreen FCF (siehe Material und Methoden) durch deutliche Grünfärbung der RNA-Puffs das Vorhandensein saurer Puff-Proteine an. Im elektronenmikroskopischen Bild wurden außer den beschriebenen Granula keine spezifischen Strukturen gefunden, die als Puff-Proteine angesehen werden könnten. Es ist daher möglich, daß die nach der RNase-Behandlung noch vorhandenen $200 - 350 \text{ \AA}$ und die $400 - 600 \text{ \AA}$ großen Granula auch saure Puff-Proteine enthalten. Da die Puff-Fibrillen nach der RNase-Einwirkung überwiegend etwas dünner sind als vor der Enzymbehandlung, ist anzunehmen, daß ein Teil des RNP diffus über die Fibrillen verteilt ist.

Die Behandlung der RNA-Puffs mit DNase hat auch bei unterschiedlicher Einwirkungsdauer (siehe Material und Methode) immer den gleichen Effekt. Die RNA-Puffs erscheinen danach strukturärmer als in unbehandelten Präparaten. Messungen ergaben, daß nach der DNase-Behandlung die Anzahl der dünneren Längsfibrillen - im Durchmesserbereich von $100 - 150 \text{ \AA}$ - zunimmt (Abb. 3). Während sich die Menge der $200 - 350 \text{ \AA}$ -Granula kaum verringert und weitgehend der Granulazahl in Puffs ohne Enzymbehandlung entspricht, ist die Zahl der als RNA-negativ beschriebenen $400 - 600 \text{ \AA}$ großen körnchenartigen Strukturen deutlich vermindert. Diese nach DNase-Einwirkung verschwundenen Granula scheinen demnach aus DNP zu

Tabelle 1

Granulagehalt (Größenbereich 200 - 350 A) in zwei RNA-Puffs von *Sciara coprophila*.

Präparat	Puff II 10 B			Puff III 12 A		
	ohne RNase-Behandlung	mit RNase-Behandlung	Granula-verlust (%)	ohne RNase-Behandlung	mit RNase-Behandlung	Granula-verlust (%)
1	57	19	67	80	22	73
2	67	20	70	78	27	65
3	56	16	72	73	19	74
4	75	21	72			

Die Auszählung der Granula erfolgte an Schnitten gleicher Dicke vollentwickelter RNA-Puffs auf der Stufe d des 4. Larvenstadiums, bei Puff III 12 A ausschließlich an den Teilen I und III (s. Abb. 1).

bestehen, während die der Enzymbehandlung widerstehenden Granula dieses Größenbereichs entweder als reine Proteinstrukturen (z.B. saure Puff-Proteine) aufzufassen sind oder als DNA-haltige Partikel angesehen werden müssen, bei denen eine Proteinhülle den Abbau vorhandener DNA verhindert bzw. verdeckt.

Zu Beginn und gegen Ende des 4. Larvenstadiums laufen die letzten beiden regulären DNA-Replikationen in *Sciara coprophila* ab. Dadurch wird jeweils die gesamte chromosomale DNA verdoppelt (Crouse und Keyl, 1968; Rasch, 1970). Diese DNA-Replikationen sind nach der Chromosomenkartierung von Gabrusewycz-Garcia (1964) den chromosomalen Entwicklungsstufen a - b und e zuzuordnen. Während dieser Stadien lassen sich in den vollentwickelten RNA-Puffs schleifenartige Strukturen unterschiedlicher Größe erkennen, wodurch der vorher verfolgbare Verlauf von längeren Fibrillenabschnitten verlorengeht. Diese Schleifenfibrillen, die in den Randbereichen der RNA-Puffs besonders deutlich sind, haben wahrscheinlich an den Puff-Längsfibrillen ihren Ursprung und kehren auch wieder dorthin zurück (Abb. 5, 6). Messungen an diesen Schleifenstrukturen ergaben Fibrillen-Durchmesser zwischen 90 und 180 Å. Die Längen der Schleifenfibrillen liegen zwischen 900 und 1600 Å. Auch die den RNA-Puffs eng benachbarten sowie die weiter entfernt liegenden Chromosomenabschnitte, die transkriptionsinaktiv sind, lassen ähnliche schleifenartige Strukturen erkennen. Diese sind wegen des dicht gepackten Chromatidenmaterials in nichtpuffenden Regionen an deren Randbereichen am deutlichsten zu erkennen. Die sichtbaren Schleifenfibrillen sind in den RNA-Puff-Abschnitten häufiger als in den angrenzenden, RNA-inaktiven Chromosomenbereichen zu sehen.

Die Bildung schleifenartiger Strukturen an Chromosomenabschnitten mit und ohne RNA-Syntheseaktivität in denjenigen Stufen des 4. Larvenstadiums, die durch den Ablauf regulärer DNA-Replikationen gekennzeichnet sind, läßt die Vermutung zu, daß das Vorhandensein schleifenartiger Strukturen durch die teilweise Entfaltung bzw. Entspiralisierung der granulären Verdichtungen des Chromatidenmaterials zustande kommt und mit dem gerade stattfindenden Ablauf von regulären DNA-Replikationen im Zusammenhang steht.

b. Struktur der DNA-Puffs

Die DNA-Puffs von *Sciara coprophila* werden erst von der Mitte des 4. Larvenstadiums an - das entspricht den chromosomalen Entwicklungsstufen c und d - deutlich sichtbar. Sie entwickeln sich in festgelegter Reihenfolge. Der DNA-Puff 9 A auf Chromosom II (II 9 A) bildet sich zuerst; es folgen auf dem gleichen Chromosom der DNA-Puff 2 B (II 2 B), auf Chromosom III der DNA-Puff 2 B (III 2 B) sowie einige andere, die nicht in die Untersuchung einbezogen wurden (Gabrusewycz-Garcia, 1964). Alle DNA-Puffs erreichen erst auf Stufe e, also gegen Ende der Larvenentwicklung, ihre volle Größe.

An den DNA-Puffs II 9 A, II 2 B und III 2 B wurden sowohl die Veränderungen im strukturellen Aufbau während des puffing untersucht als auch die DNA-Puff-Strukturen desselben Kerns miteinander verglichen. Außerdem sollte versucht werden, die Strukturunterschiede zwischen DNA- und RNA-Puffs mit bereits vorliegenden Ergebnissen über die Funktionen der beiden Puff-Arten zu korrelieren.

Zuerst wurden die DNA-Puff-Bereiche III 2 B und II 2 B auf Stufe b des 4. Larvenstadiums untersucht. In diesem Stadium beginnt die DNA-Puff-Entwicklung mit der ersten Extra-Replikation (Crouse und Keyl, 1968; Rasch, 1970). Beim Vergleich des strukturellen Aufbaus konnte an den beiden DNA-Puff-Abschnitten folgende Beobachtungen gemacht werden:

Der proximale Teil des DNA-Puff-Bereichs 2 B von Chromosom III (III 2 B₂) zeigt auf Stufe b deutliche Ähnlichkeiten mit einem vollentwickelten RNA-Puff (Abb. 7). Der distale Abschnitt besteht aus zwei elektronendichten Banden, zwischen denen zwar keine typischen RNA-Puff-Strukturen sichtbar sind, aber auch Granula im Größenbereich zwischen 200 und 500 Å nicht völlig fehlen. Im proximalen Teil des Chromosomenabschnitts III 2 B lassen sich die bereits auf Seite 4⁴ erwähnten, oft parallel zur Chromosomenachse verlaufenden Fibrillen und viele körnchenartige Strukturen erkennen, die in Größe und Lage den in RNA-Puffs vorhandenen Granula ähnlich sind. Gleichfalls mit den Ergebnissen an RNA-Puffs übereinstimmend ist der Befund, daß

die meisten der Längsfibrillen nur zwischen 100 und 250 $\overset{\circ}{\text{\AA}}$ dick sind und daß die Granula auf dieser chromosomalen Entwicklungsstufe Durchmesserwerte zwischen 200 und 500 $\overset{\circ}{\text{\AA}}$ haben. Die auffallend große Anzahl von 200 - 350 $\overset{\circ}{\text{\AA}}$ -Partikeln weist auf eine starke RNP-Synthese im proximalen Teil des Chromosomenabschnittes III 2 B hin. Mit Hilfe autoradiographischer Methoden konnte auf Stufe b an dieser Stelle RNA-Syntheseaktivität nachgewiesen werden (Abb. 8 a). Die Autoradiogramme zeigen deutlich, daß während dieser Entwicklungsstufe am distalen Teil des Abschnitts III 2 B kein oder nur geringer Einbau radioaktiv markierter RNA-Vorstufen festzustellen ist.

Der DNA-Puff-Abschnitt 2 B auf Chromosom II (II 2 B) zeigt zu Beginn der Extrareplikation (Stufe b) im 4. Larvenstadium keinen auffallenden Fibrillenverlauf parallel zur Chromosomenachse (Abb. 9). Zahlreiche schleifenartige Strukturen unterschiedlicher Länge verhindern, daß eine Vorzugsrichtung der Fibrillen erkennbar wird. Die Schleifenstrukturen scheinen - wie bereits für bestimmte Entwicklungsstadien der RNA-Puffs beschrieben - von den Puff-Längsfibrillen auszugehen und nahe der Austrittsstelle wieder in diese einzumünden. Die Dicke der Schleifenfibrillen liegt zwischen 100 und 250 $\overset{\circ}{\text{\AA}}$ (Abb. 9).

Die Gesamtstruktur des DNA-Puff-Bereichs II 2 B ist auf Stufe b bereits viel dichter als die des DNA-Puffs III 2 B im gleichen chromosomalen Entwicklungszustand (Vergleich der Abb. 7 und 9). Außer den schon erwähnten Strukturen trägt dazu die große Zahl der 400 - 600 $\overset{\circ}{\text{\AA}}$ dicken Granula bei. Während im proximalen Teil des DNA-Puff-Bereichs 2 B auf Chromosom III (III 2 B) die 200 - 350 $\overset{\circ}{\text{\AA}}$ großen RNP-Granula überwiegen (Abb. 7), ist im DNA-Puff-Abschnitt 2 B auf Chromosom II (II 2 B) die Granula-Zahl dieser Größenordnung deutlich geringer. Das bedeutet, daß die Durchmesserwerte der in beiden DNA-Puffs erkennbaren Granula zwar im gleichen Größenbereich liegen, das Mengenverhältnis der beiden Granulatypen in den beiden DNA-Puffs aber unterschiedlich ist.

Die autoradiographisch nachweisbar schwache RNA-Synthese im Puff-Bereich II 2 B stimmt mit der beobachteten relativ geringen Anzahl der RNP-Granula überein (Abb. 8 b). Die auffällige Zunahme der 400 - 600 $\overset{\circ}{\text{\AA}}$

großen Granula bedeutet also sicher nicht vermehrte Transkriptionsaktivität im Puff-Bereich; wahrscheinlicher ist, daß diese $400 - 600 \overset{0}{\text{\AA}}$ -Granula aufgefaltete DNP-Fibrillen sind und daß die Vermehrung dieser Strukturen im Zusammenhang mit der DNA-Extra-Replikation steht, die auf der Stufe b des 4. Larvenstadiums abläuft.

Die vorliegenden Untersuchungen an zwei DNA-Puff-Abschnitten auf Stufe b und den auf diese Stufe folgenden chromosomalen Entwicklungsstufen zeigen, daß sich die DNA-Puff-Strukturen in II 2 B zeitlich vor denen in III 2 B ausbilden, d.h., der DNA-Puff-Abschnitt III 2 B läßt erst gegen Ende der Stufe b bzw. zu Beginn der Stufe c die Ausbildung schleifenartigen Materials und die Anhäufung von $400 - 600 \overset{0}{\text{\AA}}$ dicken Granula erkennen, die am DNA-Puff-Bereich II 2 B schon während der Stufe b auffindbar sind. Vor der Entwicklung dieser DNA-Puff-Strukturen kann also ein RNA-Puff-ähnliches Stadium vorliegen, das durch übersichtlichen Fibrillenverlauf und viele $200 - 350 \overset{0}{\text{\AA}}$ große RNP-Granula charakterisiert ist.

Bisher konnte nur für den DNA-Puff-Bereich II 2 B das Entstehen der DNA-Puff-Strukturen durch DNA-Extra-Replikationen einer bestimmten Bande gesichert werden (Crouse und Keyl, 1968). Darum kann auch nur für diese Stelle verbindlich ausgesagt werden, daß RNA-Puff-Aktivitäten nicht in dieser Bande sondern nur in den direkt davor und dahinter liegenden Chromosomenbereichen des Abschnitts II 2 B vorkommen.

Während der anschließenden chromosomalen Entwicklungsstufen lassen sich an den DNA-Puffs folgende typische Strukturveränderungen feststellen:

Auf Stufe e und zum Teil auch schon auf der davorliegenden Stufe d verlaufen die meisten Puff-Fibrillen nicht mehr in Längsrichtung zur Chromosomenachse (Abb. 10). Diese Fibrillen bilden vielmehr ein netzartiges Gerüst, das in nicht zu stark gequetschten Chromosomen keine Vorzugsrichtung besitzt. Mit zunehmender Puff-Größe lassen sich die Fibrillen nur noch über kürzere Strecken verfolgen. Ihre Durchmesser bleiben dabei vorerst unverändert, sie betragen - wie in RNA-Puffs - vorwiegend zwischen $100 \text{ und } 250 \overset{0}{\text{\AA}}$. In den maximal entwickelten DNA-Puffs haben

die kurzen isoliert sichtbaren Fibrillenstücke Durchmesser von überwiegend $100 - 150 \text{ \AA}$ (Abb. 10, 11).

Die während der DNA-Puff-Entwicklung zunehmend dichter werdende Struktur dieser Regionen ist einerseits auf eine Zunahme des Fibrillenmaterials mit Durchmesserwerten zwischen 100 und $150 \text{ \AA}$ zurückzuführen, andererseits aber - und dieses in viel größerem Ausmaß - durch die Vermehrung von schleifen-, schrauben- und körnchenartigen Strukturen bedingt. Während zu Beginn des puffing einzelne $400 - 600 \text{ \AA}$ große Granula besonders häufig sichtbar sind (Abb. 9, 10), schließen sich diese Strukturen im weiteren Entwicklungsverlauf zu komplexen Gebilden mit Durchmesserwerten um $1000 \text{ \AA}$ (Abb. 11, 12) zusammen. Die $400 - 600 \text{ \AA}$ großen Komponenten dieser Komplexe bestehen aus unregelmäßig aufgefalteten und geknäuelten Fibrillenabschnitten und weisen einen mehr oder weniger starken Verdichtungsgrad auf (Abb. 11, 13). Eine vollständige Entspiralisierung aller Teilstrukturen dieser $1000 \text{ \AA}$ -Komplexe im Verlauf des puffing konnte niemals beobachtet werden; immer erscheint ein Teil der komplexbildenden Granula elektronenoptisch dicht und scharf begrenzt.

Die $1000 \text{ \AA}$ großen Komplexe sind perlschnurartig untereinander durch Fibrillenstücke verbunden. Solche "Ketten" sind über weite Strecken und in verschiedenem Richtungsverlauf zur Chromosomenachse durch die DNA-Puffs zu verfolgen (Abb. 10, 12). Die oft schwach spiralig erscheinenden fibrillären Zwischenstücke erreichen zumeist Durchmesser um $100 \text{ \AA}$, seltener bis zu $200 \text{ \AA}$. An den Komponenten der $1000 \text{ \AA}$ -Komplexe sind Fibrillen mit Durchmesserwerten zwischen 60 und $120 \text{ \AA}$ sichtbar.

Nach einer DNase-Behandlung zeigen sich an den ab Stufe c des 4. Larvenstadiums untersuchten DNA-Puffs folgende Veränderungen:

Wie bereits im Abschnitt III a für RNA-Puffs beschrieben wurde, erscheinen auch die DNA-Puffs nach der Enzym-Behandlung "transparenter". Die meisten Puff-Fibrillen sind dann dünner geworden, so daß der Durchmesserbereich für die am häufigsten vorhandenen Fibril-

len zwischen 80 und 120 $\overset{\circ}{\text{\AA}}$ liegt (Abb. 14, 15). Etwa ein Drittel der Puff-Fibrillen ist jedoch dicker und hat Durchmesserwerte zwischen 180 und 250 $\overset{\circ}{\text{\AA}}$. Die großen Unterschiede in der Fibrillenstärke sind - wie schon für RNA-Puffs beschrieben wurde - sowohl auf den unterschiedlichen Spiralisierungsgrad der Fibrillen zurückzuführen, scheinen aber auch durch Aggregationen mehrerer Fibrillen bzw. Anlagerung von Puff-Synthesematerial an die Fibrillen zu entstehen. Viel auffälliger als die Abnahme des Durchmessers an den meisten Puff-Fibrillen ist der Verlust von schleifenartigem Material und von Granula im Größenbereich von 400 - 600 $\overset{\circ}{\text{\AA}}$ (Abb. 14, 15). Die DNA-Puffs erscheinen dadurch nach der Enzymbehandlung nur noch als ein kompliziert aufgebautes dreidimensionales Fibrillen-Netzwerk. Die 1000 $\overset{\circ}{\text{\AA}}$ -Komplex-Ketten sind noch zu erkennen, besitzen aber kaum noch lockere schleifenartige Fibrillenanteile. Die Bereiche, an denen in nicht enzymbehandelten Puffs 1000 $\overset{\circ}{\text{\AA}}$ -Komplexe vorliegen, erscheinen jetzt als Verzweigungsstellen des Fibrillennetzes (Abb. 15).

Demgegenüber hat die Einwirkung von RNase auf die DNA-Puffs kaum sichtbare Strukturveränderungen zur Folge. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Schnitten durch halb- und vollentwickelte DNA-Puffs zeigen nur wenige der RNP-Granula von 200 - 350 $\overset{\circ}{\text{\AA}}$ Größe (Abb. 16). Da die Puffs in diesen chromosomalen Entwicklungsstufen bereits reich an dicht gepackten Strukturen sind, können Granula im genannten Größenbereich überdeckt sein und werden darum selten aufgefunden. Somit läßt sich nach einer RNase-Behandlung zwar eine Verminderung in der Granula-Anzahl der RNP-Größenordnung feststellen, dieser Befund hat jedoch aus den oben genannten Gründen wenig Aussagekraft. Daß eine - im Vergleich zu den RNA-Puffs - geringere Anzahl von RNP-Granula in den DNA-Puffs vorhanden sein muß, zeigen die autoradiographischen Präparate. Untersuchungen über die Einbauraten von Uridin-5- ^3H in die DNA-Puffs der Speicheldrüsenchromosomen haben ergeben, daß dort zwar während aller DNA-Puff-Entwicklungsstufen eine RNA-Synthese stattfindet, deren Syntheserate, verglichen mit der dort vorhandenen DNA-Menge, aber auffallend gering

ist (Abb. 8 c, d).

Am DNA-Puff II 2 B fällt in den frühen Puff-Entwicklungsstadien auf, daß über der Bande, in der die DNA-Extra-Replikationen ablaufen (Crouse und Keyl, 1968), kaum radioaktive Markierung zu finden ist (Abb. 8 b), sondern nur in unmittelbarer Nachbarschaft an den Strukturen, die mehr den Chromosomenabschnitten II 2 A und II 2 C zuzurechnen sind. Am vollentwickelten DNA-Puff II 2 B treten zwei verschiedene Markierungsmuster auf. In einigen Autoradiogrammen (z.B. Abb. 8 c) zeigt sich nur eine relativ gleichmäßige Verteilung der Silberkörnchen über dem gesamten Puff-Bereich. Andere Autoradiographien lassen erkennen, daß der proximale Teil des DNA-Puffs II 2 B besonders stark markiert ist (Abb. 8 d). Dieses Ergebnis deutet auf eine sehr variable RNA-Syntheseaktivität in den einzelnen Teilen des Puff-Bereiches II 2 B hin.

Für die restlichen DNA-Puffs in *Sciara coprophila* konnte eine Bestimmung der RNA-Syntheseaktivität nicht vorgenommen werden, da noch unklar ist, von welcher Querscheibe dort die Extra-Replikationen ausgehen.

Protein-Abbau mit Pronase P führt nach 15 Min. zu einer starken Verminderung der Fibrillenzahl. Nach 30 Min. Behandlungszeit sind alle Fibrillen völlig verschwunden. Nur granulaartige Strukturen im Größenbereich zwischen 100 und 1000 Å füllen noch den DNA-Puff an. Man gewinnt den Eindruck, daß sich die fibrillären Puff-Elemente nach einem bestimmten Proteinverlust verknäueln und daß daraus ein großer Teil der unterschiedlich dicken Granula entsteht.

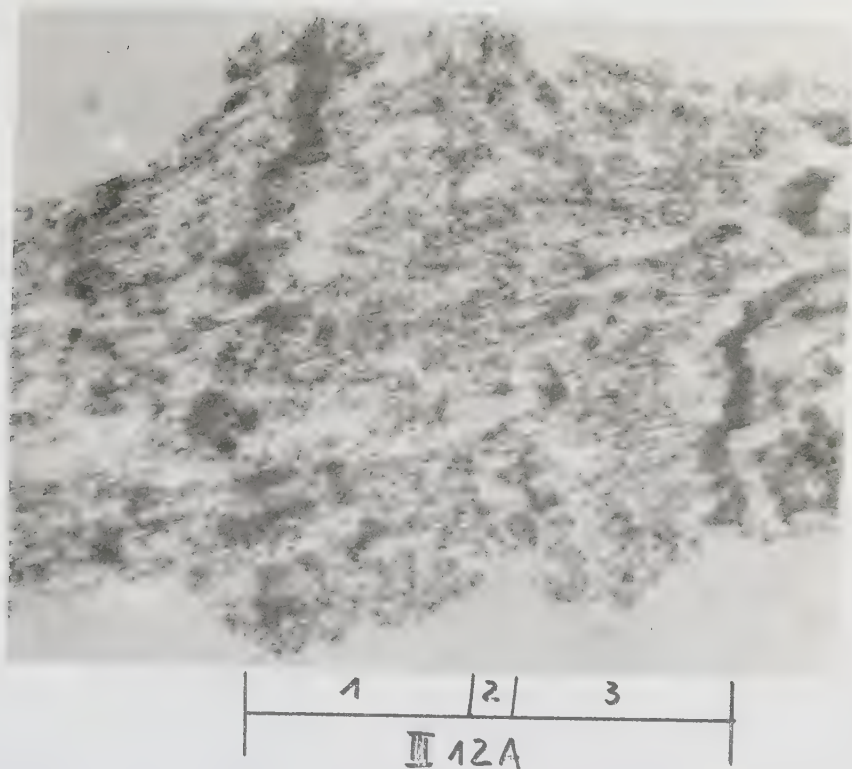


Abb. 1: RNA-Puff III 12 A auf Stufe c d des 4. Larvenstadiums.
 Der voll entwickelte RNA-Puff ist in 3 Teilabschnitte gegliedert. Der mittlere Abschnitt enthält weniger granuläre Strukturen und zeigt einen geringeren Spiralierungsgrad der Fibrillen.
 Vergr.: 16 000 x

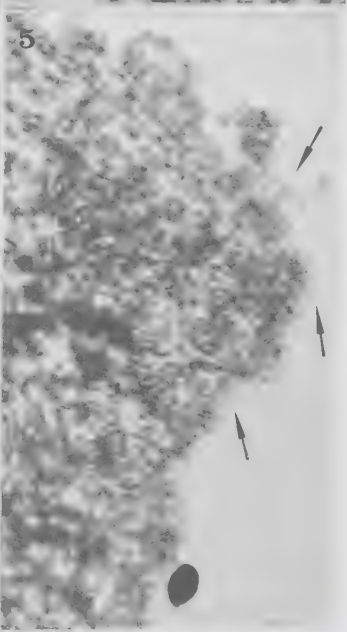
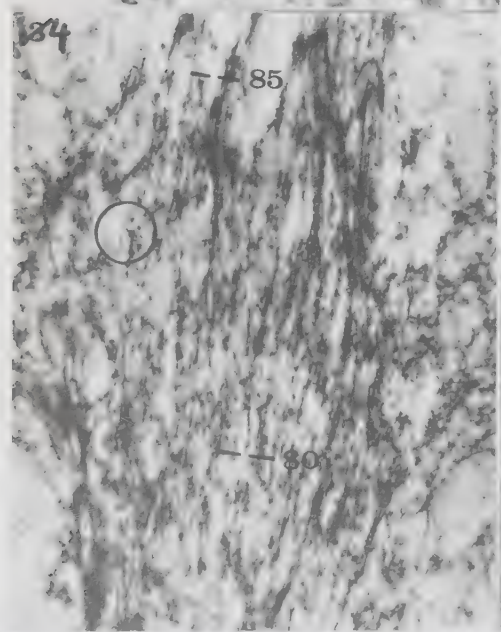
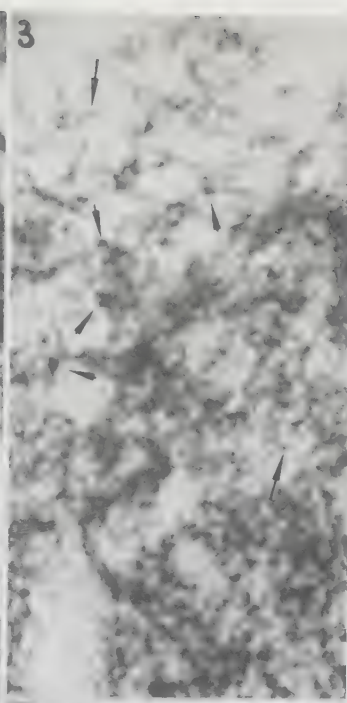
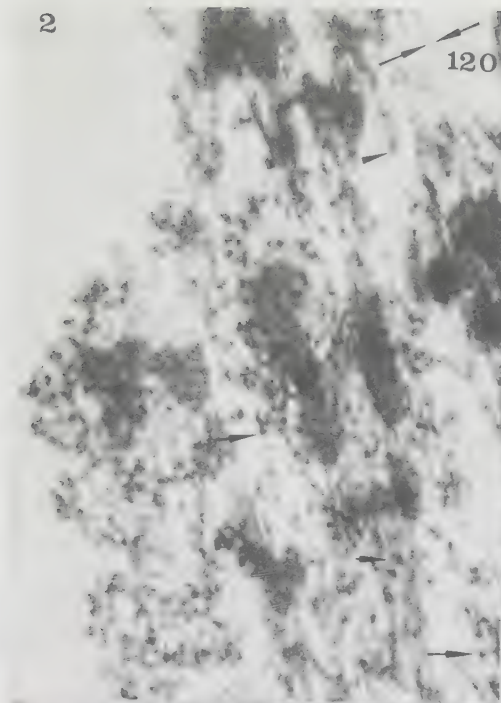


Abb. 2: RNA-Puff III 12 A auf Stufe e des 4. Larvenstadiums.
 Die Fibrillendicke ($\longleftrightarrow$) liegt zwischen 100 und 250 Å.
 Die Pfeile ($\longrightarrow$) und ($\blacktriangleright$) zeigen RNA-Puff-Granula verschiedener Größe.

$\longrightarrow$ 200 - 350 Å-Granula

$\blacktriangleright$ 400 - 600 Å-Granula

Vergr.: 26 000 x

Abb. 3: RNA-Puff II 10 B auf Stufe e des 4. Larvenstadiums nach RNase-Behandlung. Die Zahl der 200 - 350 Å-Granula ($\longleftrightarrow$) ist vermindert (s. Tabelle 1), die Menge der 400 - 600 Å-Granula ($\blacktriangleright$) bleibt nahezu konstant.

Vergr.: 32 000 x

Abb. 4: RNA-Puff II 10 B auf Stufe c des 4. Larvenstadiums nach DNase-Behandlung. Innerhalb des Kreises eine Gruppe 200 - 350 Å-Granula mit fibrillärem Kontakt zu Puff-Längsfibrillen. Die 400 - 600 Å-Granula sind deutlich vermindert; auch sind kaum schleifenartige Fibrillen zu erkennen. Fibrillendicke 80 bis 150 Å.

Vergr.: 18 000 x

Abb. 5: RNA-Puff III 12 A auf Stufe e des 4. Larvenstadiums. Im Puff-Randbereich liegen Schleifenfibrillen dicht gedrängt vor.

Vergr.: 20 000 x

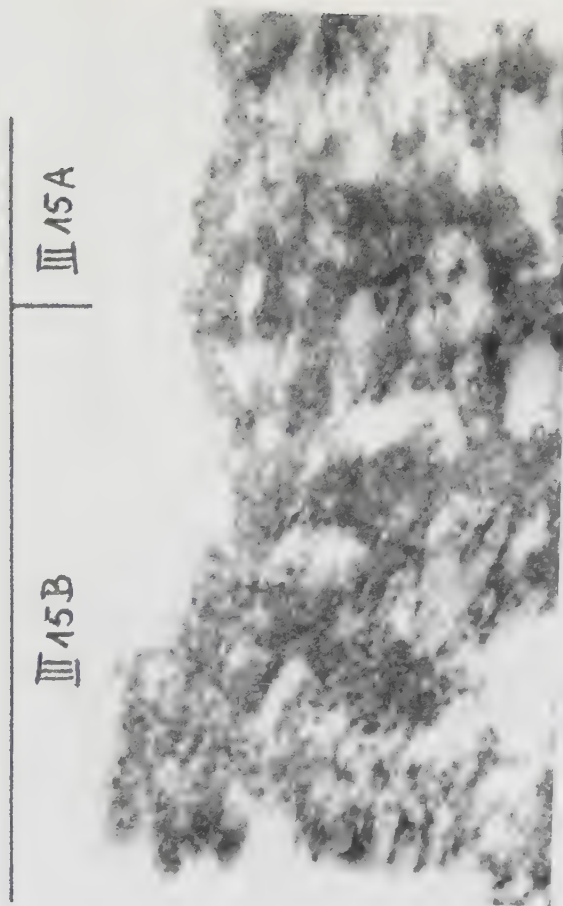


Abb. 6: RNA-Puff III 15 B auf Stufe a-b des 4. Larvenstadiums.
 Vorwiegend in den Randbereichen fallen schleifenartige
 Strukturen auf (→) (Vergleich mit Abb. 5).
 Vergr.: 30 000 x

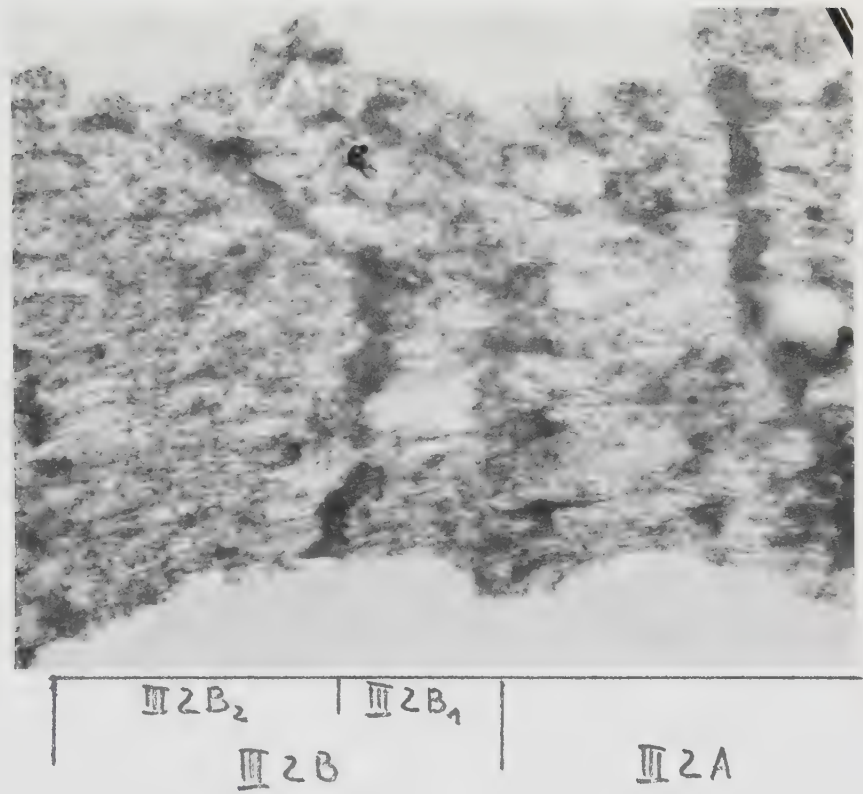


Abb. 7: DNA-Puff III 2 B auf Stufe b des 4. Larvenstadiums.
 Der Chromosomenabschnitt III 2 B gliedert sich vor der
 ersten DNA-Extra-Replikation in 2 Bereiche, von denen
 III 2 B₂ einem voll entwickelten RNA-Puff gleicht.
 Vergr.: 21 000 x

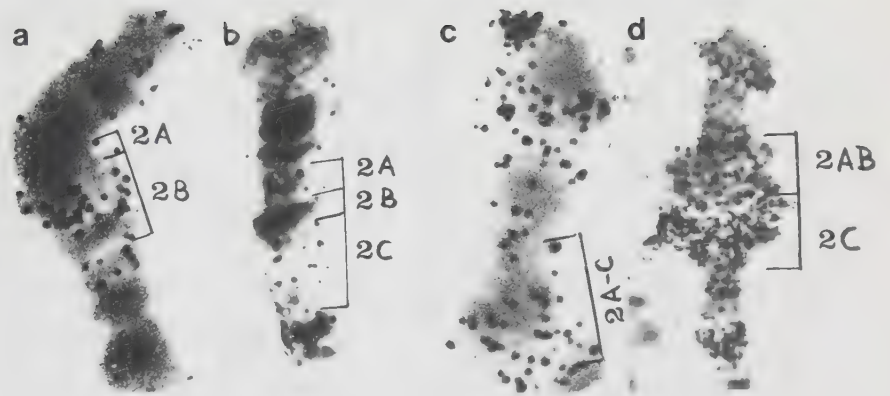


Abb. 8 a-d: Autoradiographien der Chromosomen III und II.

8 a: Chromosom III auf Stufe b-c des 4. Larvenstadiums

8 b: Chromosom II auf Stufe b-c des 4. Larvenstadiums

8 c: Chromosom II auf Stufe c des 4. Larvenstadiums

8 d: Chromosom II auf Stufe e des 4. Larvenstadiums

a-c:	Inkubationszeit des Uridin-5- ³ H	15 Min.
	Expositionsdauer	8 Tage
	Spezifische Aktivität	20 Ci/mmol
d:	Inkubationszeit des Uridin-5- ³ H	40 Min.
	Expositionsdauer	16 Tage
	Spezifische Aktivität	29 Ci/mmol

Der Chromosomenabschnitt II 2 BC zeigt eine höhere Einbau-
rate als Abschnitt II 2 A.

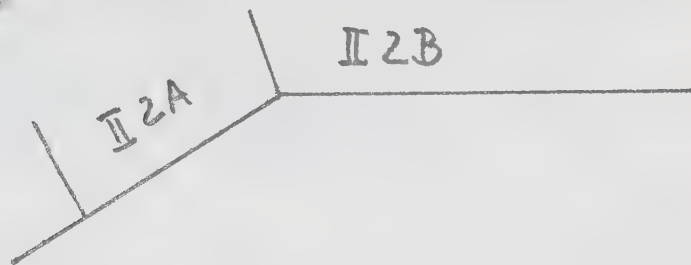
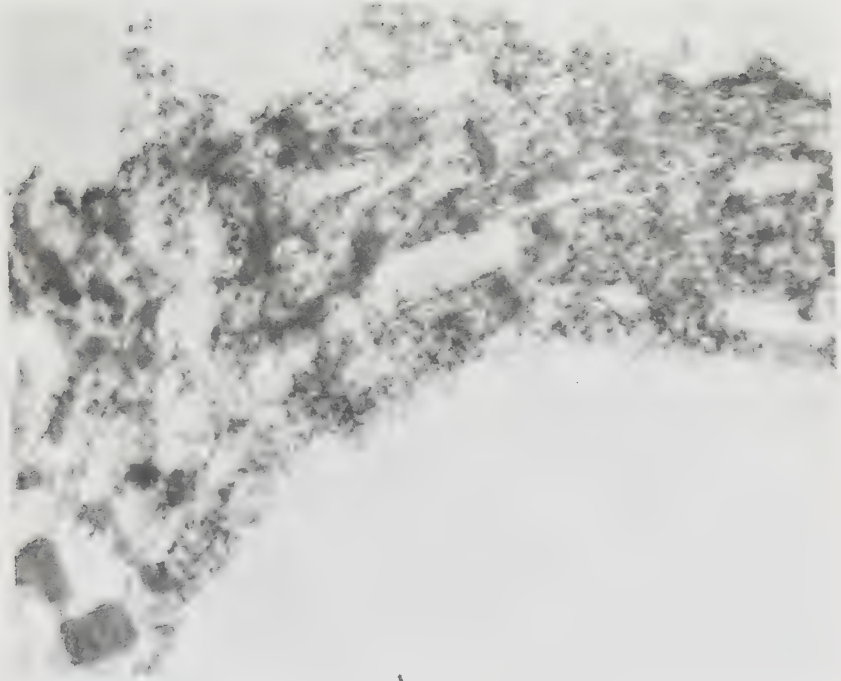


Abb. 9: DNA-Puff II 2 B auf Stufe b des 4. Larvenstadiums. Die Schleifenfibrillen sind 100 - 250 Å dick. Sie gehen wahrscheinlich von parallel zur Chromosomenachse verlaufenden Längsfibrillen aus und münden wieder in diese ein.
Vergr.: 22 000 x

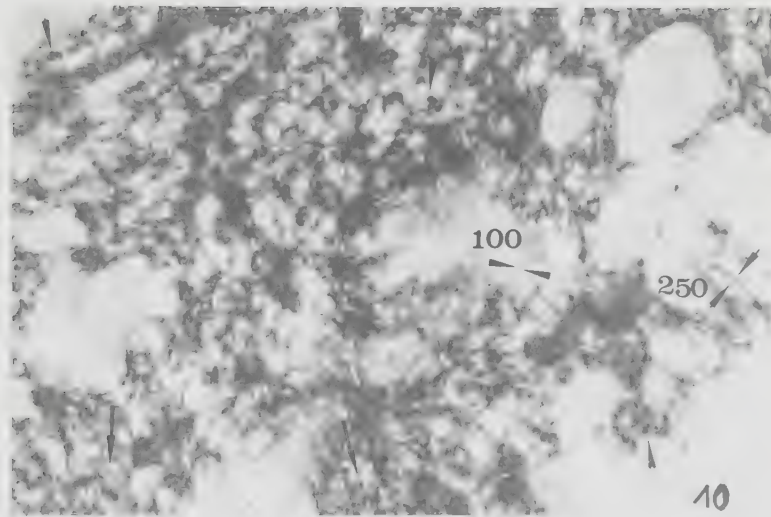


Abb. 10: Ausschnittvergr. aus Abb. 10. DNA-Puff-Granula von 400 - 600 Å (▶), DNA-Puff-Granula von 200 - 350 Å Durchmesser (—▶) sowie 1000 Å-Komplex-"Ketten" sind durch den gesamten Puff-Bereich zu verfolgen. Die Fibrillendicke ist durch Doppelpfeile bezeichnet.

Vergr.: 24 000 x

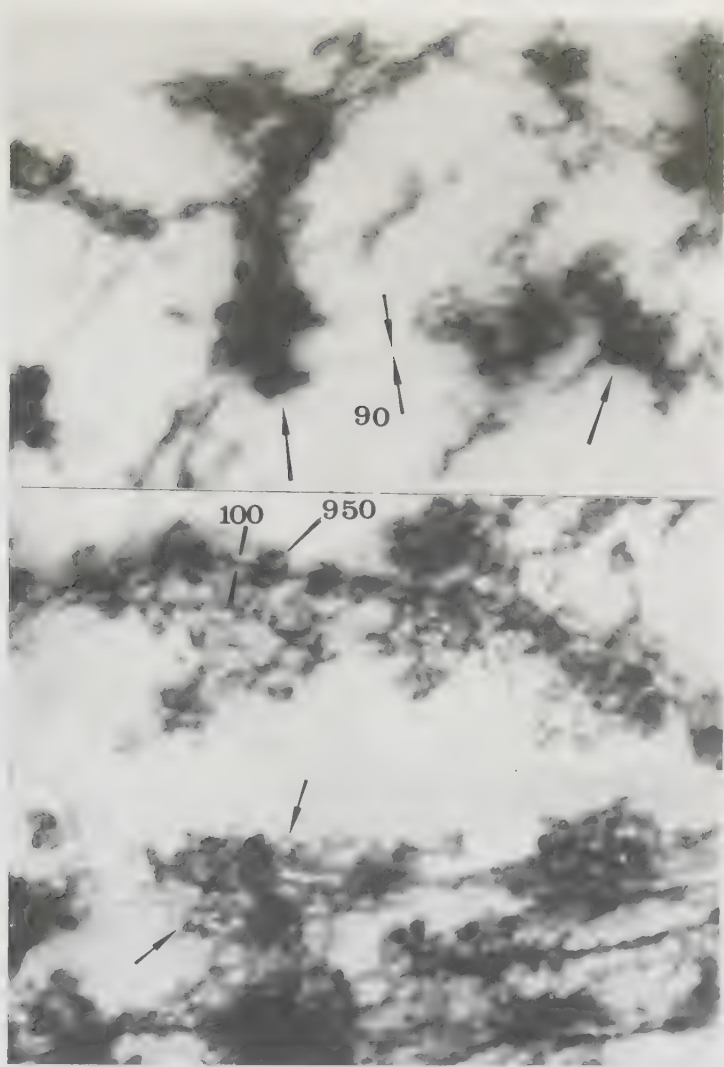


Abb. 11: DNA-Puff II 2 B auf Stufe e des 4. Larvenstadiums. Pfeile ($\rightarrow$) bezeichnen 1000 Å-Komplexe, die aus eng gefalteten und lockeren schleifenartigen Teilstrukturen aufgebaut sind. Die Zahlen an den Doppelpfeilen ($\longleftrightarrow$) geben den Durchmesser des betreffenden Fibrillenstückes in an.

Vergr.: 80 000 x

Abb. 12: DNA-Puff II 2 B auf Stufe e des 4. Larvenstadiums. Eine "Kette" aus 1000 Å-Komplexen ist deutlich sichtbar. Die Durchmesser der die 1000 Å-Komplexe verbindenden Fibrillen betragen 100 - 150 Å.

Vergr.: 60 000 x

Abb. 13: DNA-Puff II 2 B auf Stufe e des 4. Larvenstadiums. Die 1000 Å-Komplexe sind überwiegend aus lockeren schleifenartigen Fibrillen ($\rightarrow$) mit Durchmessern zwischen 60 und 120 Å aufgebaut.

Vergr.: 80 000 x

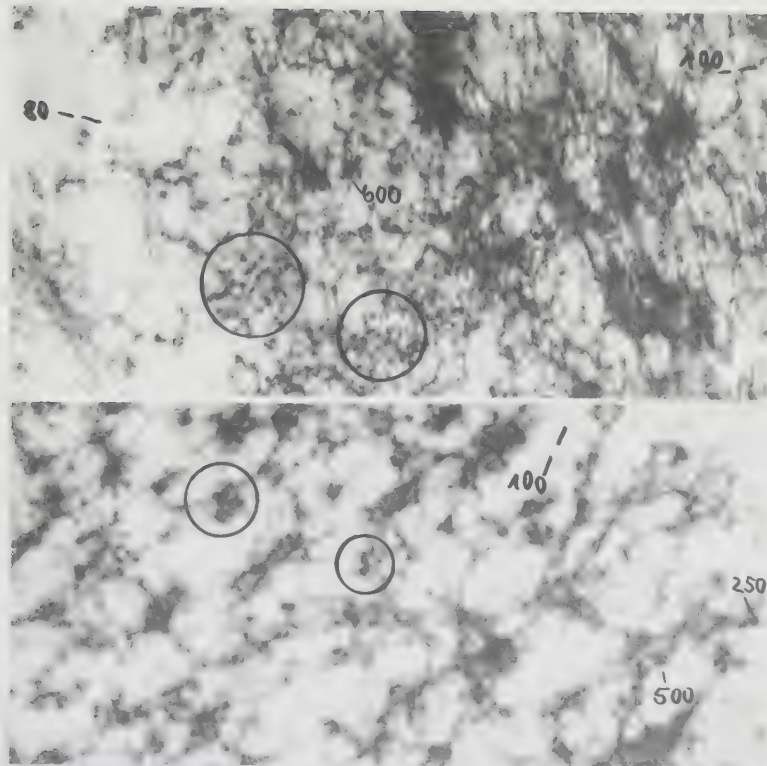


Abb. 14: DNA-Puff III 2 B auf Stufe e des 4. Larvenstadiums nach DNase-Behandlung. Typische Strukturveränderungen nach Enzym-Einwirkung sind: Überwiegend 200 - 350 Å große Granula (z.B. in den Kreisen), Mengenverlust an 400 - 600 Å-Granula, Abnahme lockeren schleifenartigen Materials gegenüber eng spiralisierten granulären Strukturen und die Verringerung der Fibrillendurchmesser auf 100 - 150 Å.

Vergr.: 36 000 x

Abb. 15: DNA-Puff II 2 B auf Stufe e des 4. Larvenstadiums nach DNase-Behandlung. Es überwiegen Granula im 200 - 350 Å-Bereich (z.B. in den Kreisen) gegenüber den 400 - 600 Å-Granula. Die 1000 Å-Komplexe sind aus schleifenartig lockerem und granulaartig dichtem Material aufgebaut. Nach DNase-Behandlung überwiegen die elektronendichten Anteile dieser Komplexe.

Vergr.: 40 000 x

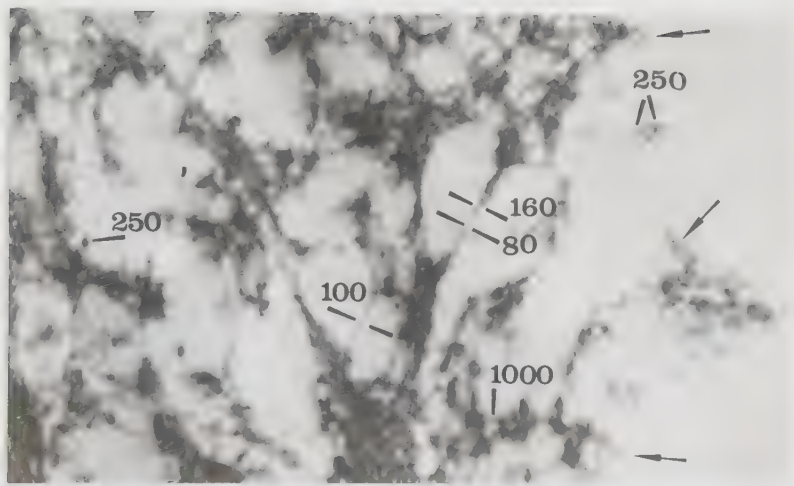


Abb. 16: DNA-Puff II 2 B auf Stufe c-d des 4. Larvenstadiums nach RNase-Behandlung. Die Anzahl der 200 - 350 Å-Granula ist deutlich verringert. (Vergleich mit Abb. 16). An bezeichneten Stellen (—▶) liegen Strukturen vor, die wie leere Begrenzungshüllen bzw. wie Schleifen aussehen. Sie bestehen aus einer Doppelmembran bzw. -fibrille und haben Durchmesser zwischen 200 und 400 Å. Es könnten DNP-Anteile der RNP-Granula sein.

Vergr.: 60 000 x

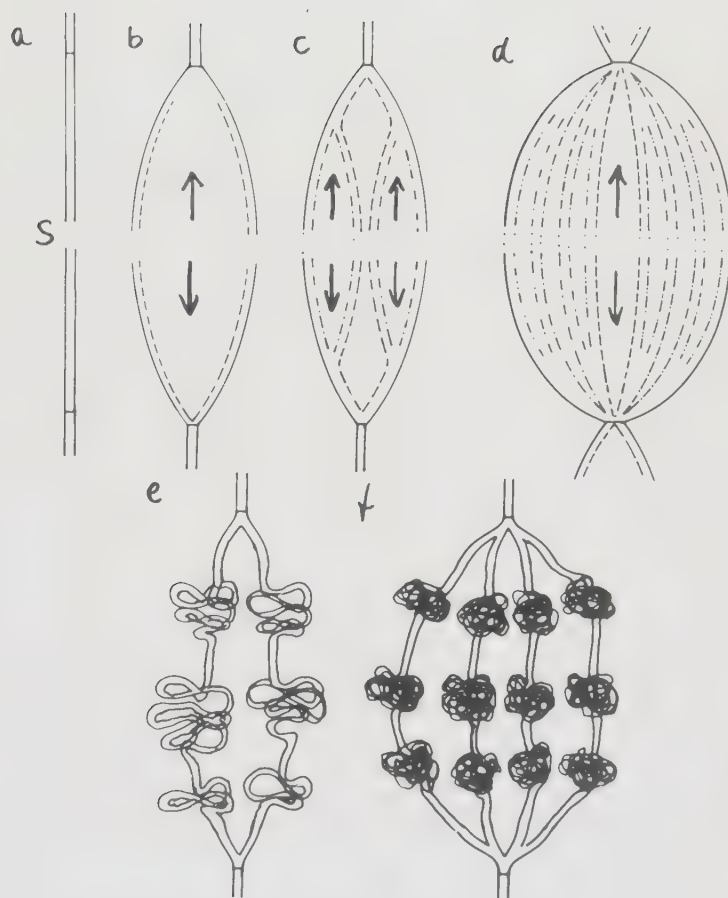


Abb. 17 a-f: Modell über den Verlauf der DNA-Replikationen in *Sciara coprophila*. (Zur Erläuterung siehe Text ab Seite 18.)

- : Nucleotidstrang vor den DNA-Extra-Replikationen
- : DNA-Extra-Replikation auf Stufe b des 4. Larvenstadiums
- .-.-.-.-: DNA-Extra-Replikation auf Stufe d-e des 4. Larvenstadiums
- .-.-.-.-: Letzte reguläre DNA-Verdopplung auf Stufe e des 4. Larvenstadiums

IV. Diskussion

Die DNA-Puffs in *Sciara coprophila* waren bis zum Beginn der vorliegenden Untersuchungen durch folgende Merkmale charakterisiert:

a. Nach den regulären und den Extra-DNA-Replikationen während des 4. Larvenstadiums ist in allen Puffs eine nahezu geometrische DNA-Zunahme feststellbar (Crouse und Keyl, 1968; Rasch, 1970). Die Menge der an den DNA-Puffs in Chromosom II und III gebildeten Extra-DNA beträgt 10 - 12 % der gesamten Kern-DNA (Rasch, 1970).

b. Die DNA-Extra-Synthesen sind hinsichtlich des zeitlichen Ablaufs unabhängig von den regulären chromosomalen DNA-Replikationen. Außerdem produzieren die DNA-Puff-Bereiche von *Sciara coprophila* unterschiedliche Mengen an Extra-DNA (Rasch, 1970).

c. Die DNA-Puffs erscheinen bereits während ihrer Entwicklung auf Grund besonders intensiver Farbstoffbindung als heterochromatische Chromosomenabschnitte (Crouse, 1968). Vergleichbare Beobachtungen liegen an den durch DNA-Extra-Replikation vergrößerten Chromosomenbanden in den polytären Chromosomen von *Sciara ocellaris* vor (Perondini und Dessen, 1969).

d. Während das puffing in RNA-Puffs auf eine weitgehende Entfaltung des Chromatins zurückzuführen ist, läßt sich das auffallende puffing der DNA-Puff-Abschnitte von *Sciara coprophila* nicht allein auf diese Weise erklären. Sauaia und Mitarbeiter (1971) fanden, daß nach der Einwirkung von OH-Harnstoff auf *Sciariden*-Larven (*Bradysia mogiensis*) die Ausbildung der DNA-Puffs gehemmt wird. Dieser Prozeß muß primär durch die Blockierung der DNA-Synthese bedingt sein, denn die RNA-Puffs verändern sich nach der OH-Harnstoff-Gabe nicht. Das puffing der DNA-Puff-Bereiche scheint danach funktionell mit der Anhäufung von DNA-Material zusammenzuhängen. Wird die DNA-Synthese verhindert, dann entwickelt sich keine puffähnliche Struktur.

Bei den vorliegenden Untersuchungen an den DNA- und RNA-Puffs in *Sciara coprophila* galt besonderes Interesse der Frage, ob strukturelle Veränderungen an den Chromosomen auftreten, die mit den DNA-Extra-Replikationen in Verbindung gebracht werden können.

Cytophotometrische Untersuchungen über den Zeitpunkt der DNA-Extra-Replikationen ergaben für den DNA-Puff II 2 B, daß während der chromosomalen Entwicklungsstufen b und d - e zwei DNA-Extra-Replikationen ablaufen (Crouse und Keyl, 1968; Rasch, 1970). Von anderen DNA-Puffs sind ebenfalls Zeitpunkt und Anzahl der DNA-Extra-Replikationen bekannt (Rasch, 1970). Die vorliegenden elektronenmikroskopischen Befunde zeigen, daß während der genannten Stadien in den DNA-Puffs von *Sciara* schleifenartige Strukturen vorhanden sind, die wahrscheinlich von den Puff-Längsfibrillen gebildet werden. Solche Schleifenfibrillen sind in den benachbarten Chromosomenabschnitten nicht zu erkennen. Ähnliche Verhältnisse findet man auch in den RNA-Puffs und den angrenzenden Chromosomenabschnitten ab Stufe a - b des 4. Larvenstadiums. Da die Schleifen in den DNA-Puff-Bereichen auf die Stufen b und d - e begrenzt sind, könnte ihr Vorhandensein mit einer gerade erfolgenden DNA-Extra-Replikation zusammenhängen.

Das während des Zeitpunkts regulärer DNA-Verdopplungen (Stufe a - b und e) in den RNA-Puff-Bereichen und den angrenzenden RNA-inaktiven Chromosomenabschnitten sichtbare schleifenartige Fibrillenmaterial ist dem in DNA-Puff-Abschnitten gefundenen ähnlich. Die Schleifen sind allerdings kürzer und nicht so häufig wie in DNA-Puffs anzutreffen.

Wenn die Annahme eines Zusammenhangs zwischen dem Vorhandensein schleifenartigen Fibrillen-Materials und einer gerade erfolgenden DNA-Replikation richtig ist, dann gleicht der im elektronenmikroskopischen Bild sichtbare Ablauf von DNA-Extra-Synthesen dem von regulären Replikationen weitgehend (Vergleich der Abb. 5, 6 und 9). Die morphologischen Befunde über den Ablauf der chromosomalen DNA-Verdopplung geben demnach keine Auskunft über eine besondere Aufgabe der Extra-DNA in den DNA-Puffs von *Sciara coprophila*.

Mehrere Autoren haben versucht, über die RNA-Syntheseaktivität der DNA-Puffs die Bedeutung und Art der extrareplizierenden DNA zu klären. Nach Untersuchungen von Armelin u.a. (1969) über die RNA-Syntheseaktivität von *Rhynchosciara* während der DNA-Puff-Entwicklung

im 4. Larvenstadium zeigte sich eine Abnahme in der Bildung von ribosomaler RNA (r-RNA) und eine Zunahme an schwerer und polydisperser RNA bei gleichzeitiger starker Proteinsynthese im Cytoplasma. Ob eine Beziehung zwischen diesen beiden Phänomenen und der DNA-Puff-Entwicklung besteht, ist unsicher, da Greenberg (1969) an älteren Speicheldrüsen von *Drosophila* die gleichen Beobachtungen über die RNA-Syntheseaktivität machte, *Drosophila* jedoch keine DNA-Puffs besitzt.

Mehr Aufschluß über den Charakter der Extra-DNA erbrachten Hybridisierungsversuche mit radioaktiver r-RNA (Pardue u.a., 1970). In *Sciara coprophila* liegen extrachromosomal DNA-haltige Partikel, sogenannte Micronucleoli, vor, die mit großer Wahrscheinlichkeit von einem oder mehreren auf dem X-Chromosom gelegenen "Nucleoli-Organisatoren" gebildet werden. Während die DNA dieser Micronucleoli mit der radioaktiven r-RNA hybridisierte, zeigte sich keinerlei Reaktion der r-RNA mit den DNA-Puffs. Das bedeutet, daß zwar in den Micronucleoli und einigen anderen Chromosomenabschnitten r-DNA vorliegt bzw. gebildet wird, daß aber in DNA-Puffs von *Sciara* keine nachweisbaren Mengen an r-DNA enthalten sind. In diesem Ergebnis spiegelt sich auch der grundsätzliche Unterschied zwischen der Bildung multipler Nucleoli durch differentielle Genamplifikation verschiedener Chromosomenbereiche bei Amphibien (Gall, 1968 und 1969; Brown und David, 1968) und Insekten (Gabrusewycz-Garcia und Kleinfeld, 1966; Bier, Kunz und Ribbert, 1967; Lima de-Faria, 1966, 1968; Kunz, 1969) und der Bildung von Extra-DNA bei Sciariden (Lit. bei Crouse und Keyl, 1968; Rasch, 1970) wieder. Während im erstgenannten Fall durch die differentielle Genamplifikation nahezu nur r-DNA entsteht, die hauptsächlich extrachromosomal nachweisbar ist, verbleibt die bei den DNA-Extra-Replikationen in Sciariden gebildete DNA an ihrem Bildungsort und codiert keine r-RNA. Die Annahme von Gall (1969), daß die in den DNA-Puffs amplifizierte DNA wenigstens zu einem Teil aus r-DNA besteht, hat sich nach den Versuchen von Pardue u.a. (1970) nicht bestätigt. Ribosomale Cistrons wurden bei *Sciara coprophila* nur an den

Centromer-Regionen, an einem Ende des X-Chromosoms und in den oben erwähnten Micronucleoli gefunden. Eckhardt und Gall (1971) erbrachten an *Rhynchosciara angelae* den Nachweis, daß die DNA-Puffs auch keine Satelliten-DNA enthalten.

Da also die in den DNA-Puffs von Sciariden vermehrten Nucleotidsequenzen weder Satelliten- noch r-DNA sind, muß ein deutlicher Funktionsunterschied zwischen der Extra-DNA in Sciariden und der durch differentielle Genamplifikation vermehrten r-DNA in Amphibien und Insekten bestehen.

DNA-Synthesen, die gleichzeitig an vielen Abschnitten der Chromosomen ablaufen, weisen auf das Vorhandensein selbständig replizierender Einheiten hin (Plaut u.a. 1966; Hubermann und Riggs, 1968), die seit Jacob und Brenner (1963) als Replikon bezeichnet werden. Nach autoradiographischen Untersuchungen von Hubermann und Riggs (1968) sind sie durchschnittlich 30μ lang; nach Derksen und Beffrendes (1970) haben sie eine mittlere Länge von 24μ . Hubermann und Riggs betonen aber, daß es auch sehr kurze Replikons geben kann, die mit Hilfe der Autoradiographie nicht auffindbar sind. Rudkin (1961) und Edström (1964) geben an, daß die DNA-Längen in Querscheiben von polytären Chromosomen zwischen 3 und 50μ und in Interbanden etwa $0,3\mu$ betragen.

Die deutlich sichtbare Bande, von der die Bildung des DNA-Puffs II 2 B in *Sciara coprophila* ausgeht, besitzt nach cytophotometrischen Messungen von Keyl (pers. Mitteilung) eine Länge von ungefähr 95μ . Dieser Wert könnte einem langen Replikon entsprechen. Diese Annahme wird durch den Befund von Gabrusewycz-Garcia (1964) gestützt, nach dem DNA-Replikationen in den DNA-Puff-Bereichen länger dauern, als in den angrenzenden Chromosomenabschnitten.

Die Befunde über die ultrastrukturellen Veränderungen während der Extra-Replikationen lassen sich an dem in Abb. 17 dargestellten Modell interpretieren. Dabei wird von den bei Hubermann und Riggs (1968) und Weintraub (1972) entwickelten Vorstellungen ausgegangen, nach denen der Insertionsbereich für die DNA-Synthese im Mittelabschnitt des Replikons liegen soll. Die aus dem Modell abgeleiteten Konsequenzen

für die Chromosomenstruktur sind aber auch zutreffend, wenn entsprechend der ursprünglichen Definition die DNA-Synthese von einem Ende des Replikons zum anderen hin fortschreitet. Die Ausgangsstruktur für dieses Modell ist die in den Puffs überwiegend festgestellte DNA-Fibrille mit Durchmesserwerten zwischen 100 und 250 Å. Eine weitgehend gestreckte Puff-Fibrille von 100 Å kann nach DuPraw (1965) noch als eine DNA-Doppelhelix mit Proteinhülle aufgefaßt werden. Wie in Abb. 17 a - c dargestellt, werden die bei den Extra-Replikationen entstehenden DNA-Moleküle durch Ringschluß direkt miteinander verbunden und indirekt von den beiden primär vorhandenen Nucleotidsträngen gehalten. Die neu aufgebauten Doppelstränge falten sich nach dem Ringschluß zu Schleifen- und danach zu Körnchenstrukturen, die den 400 - 600 Å-Granula entsprechen (Abb. 17 e, f). Dadurch verkürzen sich die Replikons im DNA-Puff-Bereich und bewirken, daß auf die angrenzenden Fibrillenabschnitte - auch auf die aus Bereichen ohne Extra-DNA-Replikation - ein mechanischer Zug ausgeübt wird, der sie zu einer teilweisen Entspiralisierung zwingt. In lichtmikroskopischen Abbildungen (Gabrusewycz-Garcia, 1964; Crouse und Keyl, 1968) und den vorliegenden elektronenmikroskopischen Bildern vom DNA-Puff II 2 B ist deutlich sichtbar, daß die an den DNA-Puff-Bereich angrenzenden Banden der Abschnitte II 2 A und II 2 C mit in das puffing einbezogen werden. Die Vorstellung von einer Auffaltung der Extra-DNA an vielen Stellen längs der Fibrillen stützt sich auf die Anhäufungen von Granula und lockeren Schleifenstrukturen im DNA-Puff-Bereich und auf das Fehlen solcher Strukturen in direkt angrenzenden Chromosomenabschnitten. Die Anordnung des Puff-Materials spricht dafür, daß alle parallel zueinander angeordneten Replikons im DNA-Puff-Bereich an den Extra-DNA-Replikationen beteiligt sind. Ob der Puff an Abschnitt II 2 B nur ein oder mehrere hintereinander angeordnete Replikons umfaßt, ist nicht zu entscheiden. Die gestreckten Fibrillenabschnitte zwischen den 1000 Å-Komplexen haben den gleichen Durchmesser wie die vor Beginn des DNA-puffing im Chromosom vorhandenen Fibrillen. Diese fibrillären Zwischenstücke werden mit zunehmender Anzahl von DNA-Extra-Replikationen kürzer und zeigen Ab-

weichungen von der bis dahin bevorzugten Orientierung parallel zur Längsachse des Chromosoms.

Nach den beiden Extra-Replikationen am DNA-Puff II 2 B findet eine weitere Replikation statt, die das gesamte Chromosomenmaterial umfaßt (Crouse und Keyl, 1968; Rasch, 1970). Das Modell (Abb. 17 d) zeigt, wie dieser letzte Replikationsschritt an polytären Chromosomen auch von der Extra-DNA durchgeführt werden kann.

An Autoradiographien früher DNA-Puff-Entwicklungsstufen des Abschnitts II 2 B läßt sich nachweisen, daß die Bande, die für die DNA-Extra-Replikationen allein verantwortlich ist, an der RNA-Synthese der benachbarten Abschnitte nicht beteiligt wird. Der Eindruck, daß mit zunehmender Puff-Entwicklung auch die Extra-DNA RNA-syntheseaktiv wird, beruht offensichtlich nur darauf, daß der DNA-Puff mit den beiden angrenzenden RNA-Puffs eine äußerlich einheitlich wirkende Puff-Struktur liefert.

Die Annahme, daß an der Extra-DNA keine Transkriptionen stattfinden, wird durch die Befunde von Sauaia u.a. (1971) an *Bradysia mogiensis* gestützt. Dort kann die DNA-Puff-Entwicklung durch OH-Harnstoff im 4. Larvenstadium gehemmt werden; die Entwicklung, Struktur und Aktivität der RNA-Puffs verändern sich dabei jedoch nicht. Metamorphose und Fortpflanzungsfähigkeit der behandelten Tiere werden nicht beeinträchtigt. Der Gesamt-RNA-Verlust durch die OH-Harnstoff-Behandlung beträgt nach Sauaia zwischen 8 und 12 %. Demnach scheint die extrareplizierte DNA nicht die Funktion amplifizierter Transkriptionseinheiten für lebenswichtige Proteine zu besitzen, wie dies verschiedentlich betont worden ist (u.a. Pavan, 1965, 1969; Crouse, 1968). Es stellt sich die Frage, weshalb an den DNA-Puffs, trotz des Fehlens von Transkriptionen in messbarem Ausmaß ein puffing auftritt. Das Übergreifen des benachbarten RNA-puffing erscheint als Erklärung nicht ausreichend. Zweifellos sind puffing und Transkription Vorgänge, die nicht zwangsläufig miteinander verbunden sein müssen. Walter (1973) hat gefunden, daß bei der Chironomide *Glyptotendipes* heterochromatische Chromosomenabschnitte Puffs bilden können, ohne daß dort RNA-Synthese nachweisbar ist.

Es sind jedoch an diesen Puffs, genau wie an den normalen, saure Proteine nachweisbar. Der gleiche Nachweis konnte auch an den gepufften Abschnitten der Extra-DNA bei *Sciara* geführt werden.

Bei *Sciara coprophila* ist außer den genannten DNA-Puffs, die Extra-DNA bilden und speichern können, noch das eine Ende des X-Chromosoms als Ort zusätzlicher DNA-Synthese bekannt (Gabrusewycz-Garcia und Kleinfeld, 1966). Die dort produzierte DNA gehört zum Typ der r-DNA (Pardue u.a. 1970). Sie löst sich in Form sogenannter Mikronucleoli vom Entstehungsort ab und liegt danach an vielen Chromosomenabschnitten, auch an DNA- und RNA-Puffs, vor. Ob noch andere Chromosomenbereiche außer denen am X-Chromosom r-DNA in Form von Mikronucleoli herstellen ist unbekannt.

Es ist denkbar, daß es sich bei den DNA-Puff-Bereichen von *Sciara coprophila* um Nucleolus-Organisatoren handelt, die während der Evolution die Fähigkeit zur Abgabe der zusätzlich replizierten DNA in Form von Mikronucleoli verloren haben. In diesem Zusammenhang erübrigt sich dann auch die Übertragung der dort liegenden Informationen.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H.-G. Keyl danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit, sein stetes Interesse an ihrem Fortgang sowie für kritische Diskussionen. Mein Dank gilt auch Frau Werres und Herrn Troß für ihre gute technische Assistenz.

Literaturverzeichnis

- Armelin, M.A., Meneghini, R., Lara, F.J.S.: Patterns of Ribonucleic Acid Synthesis in Salivary Glands of *Rhynchosciara angelae* larvae. *Genetics Suppl.* 61: 1, 351-360 (1969).
- Bier, K., Kunz, W., Ribbert, D.: Struktur und Funktion der Oocytenchromosomen und Nukleolen sowie der Extra-DNS während der Oogenese panoistischer und meroistischer Insekten. *Chromosoma (Berl.)* 23, 214-254 (1967).
- Breuer, M.E., Pavan, C.: Behavior of Polytene Chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. *Chromosoma (Berl.)* 7, 371-386 (1955).
- Brown, D.D., David, I. B.: Specific gene amplification in Oocytes. *Science* 160, 272-280 (1968).
- Crouse, H.V.: The role of ecdysone in DNA-puff formation and DNA synthesis in the polytene chromosomes of *Sciara coprophila*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 61, 971-978 (1968).
- Crouse, H.V., Keyl, H.-G.: Extra Replications in the "DNA-Puffs" of *Sciara coprophila*. *Chromosoma (Berl.)* 25, 357-364 (1968).
- Derksen, J., Berendes, H.D.: Polytene chromosome structure at submicroscopic level. *Chromosoma (Berl.)* 31, 468-477 (1970).
- Du Praw, E.J.: Macromolecular organization of nuclei and chromosomes: a folded fibre model based on whole-mount electron microscopy. *Nature* 206, 338-343 (1965).
- Eckardt, R.A., Gall, J.G.: Satellite DNA associated with Heterochromatin in *Rhynchosciara*. *Chromosoma (Berl.)* 32, 407-427 (1971).
- Edström, J.E.: Chromosomal RNA and other nuclear RNA fractions. In: *Role of chromosomes in development*, New York, Academic Press 1964 (ed. Michael Locke).

- Gabrusewycz-Garcia, N.: Cytological and autoradiographic Studies in *Sciara coprophila* salivary gland chromosomes. *Chromosoma* (Berl.) 15, 312-344 (1964).
- Gabrusewycz-Garcia, N., Kleinfeld, R.G.: A study of the nucleolar material in *Sciara coprophila*. *J. Cell Biol.* 29, 347-359 (1966).
- Gabrusewycz-Garcia, N.: Studies in polytene chromosomes of *Sciarids* I. The salivary chromosomes of *Sciara* (*Lycoriella*) *pauciseta* (II), Felt. *Chromosoma* (Berl.) 33, 421-435 (1971).
- Gall, J.G.: Differential synthesis of the genes for ribosomal RNA during amphibian oogenesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)* 60, 553-560 (1968).
- Gall, J.G.: The genes for ribosomal RNA during oogenesis. *Genetics* 61 (Suppl.), 121-132 (1969).
- Greenberg, J.R.: Synthesis and properties of ribosomal DNA in *Drosophila*. *J. Mol. Biol.* 46, 85-98 (1969).
- Hägele, K.: DNS-Replikationsmuster der Speicheldrüsen-Chromosomen von Chironomiden. *Chromosoma* (Berl.) 31, 91-138 (1970).
- Hubermann, J. A., Riggs, A. D.: On the mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes. *J. Mol. Biol.* 32, 327-341 (1968).
- Jacob, F., Brenner, S.: Sur la regulation de la synthese du DNA chez les bacteries: L'hypothese du replikon. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 256, 298-311 (1963).
- Kunz, W.: Die Entstehung multipler Oocytennukleolen aus akzessorischen DNS-Körpern bei *Gryllus domesticus*. *Chromosoma* (Berl.) 26, 41-75 (1969).
- Lima-de Faria, A., Moses, M. J.: Ultrastructure and cytochemistry of metabolic DNA in *Tipula*. *J. Cell Biol.* 30, 177-192 (1966).
- Lima-de Faria, A. et al.: Tritium labelling and cytochemistry of Extra-DNA in *Acheta*. *Chromosoma* (Berl.) 25, 1-20 (1968).

- Pardue, M. L., Gerbi, S. A., Eckhardt, R. A., Gall, J. G.:
Cytological localization of DNA complementary of ribosomal RNA
in polytene chromosomes of Diptera. *Chromosoma (Berl.)* 29,
268-290 (1970).
- Pavan, C.: Morphological and physiological aspects of chromosomal
activities. *Proc. X. Int. Congr. Genet.* 1959, 321-336.
- Pavan, C.: Nucleic acid metabolism in polytene chromosomes and
the problem of differentiation. *Brookhaven Symp.* 18, 223-241 (1965).
- Pavan, C., da Cunha, A. B.: Chromosomal activities in *Rhynchosciara*
and other Sciaridae. *Ann. Rev. Genet.* 3, 425-450 (1969).
- Perondini, A. L. P., Dessen, E. M.: Heterocycous puffs in *Sciara*
ocellaris. *Genetics (Suppl.)* 61:1, 252-260 (1969).
- Plaut, W.: On ordered DNA replication in polytene chromosomes.
Genetics (Suppl.) 61, 239-244 (1969).
- Rasch, E. M.: Two-wavelength cytophotometry of *Sciara* salivary
gland chromosomes. In: *Introduction to Quantitative Cytochemistry*
II (ed. G. L. Wied and G. F. Bahr), 335-355, Acad. Press New York
and London 1970.
- Rudkin, G. T.: Cytochemistry in the ultraviolet. *Microchem. J. Symp.*
Ser. 1, 261-276 (1961).
- Ruthmann, A.: *Methoden der Zellforschung*. Franckh'sche Verlags-
handlung Stuttgart 1966.
- Sauaia, H., Laicine, E. M., Alves, M. A. R.: Hydroxyurea-Induced
inhibition of DNA puff development in the salivary gland chromosomes
of *Bradysia hygida*. *Chromosoma (Berl.)* 34, 129-151 (1971).
- Walter, L.: Syntheseprozesse an den Riesenchromosomen von
Glyptotendipes. *Chromosoma (Berl.)* 41, 327-360 (1973).
- Weintraub, H.: Bi-directional initiation of DNA-Synthesis in develo-
ping chick erythroblasts. *Nature* 236, 195-197 (1972).

Lebenslauf

Am 4. Mai 1942 wurde ich, Cornelia Welsch, geb. Becker, in Bleicherode/Harz geboren. Meine Eltern sind der Lehrer Meinhart Becker und die Lehrerin Annemarie Becker geb. Hofmann. Ich habe noch einen Bruder.

Meine Kindheit und Jugend verlebte ich in Sondershausen/Thüringen. Dort besuchte ich von 1948 bis 1956 die Grundschule und anschließend den mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig der erweiterten Oberschule. Im Juni 1960 schloß ich meine Schulzeit mit der Reifeprüfung ab.

Vom Herbstsemester 1960 ab studierte ich an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena Biologie und Chemie. Dieses Studium beendete ich im Juni 1964 mit dem Staatsexamen in den angegebenen Fächern für das Lehrfach an polytechnischen Oberschulen. Anschließend unterrichtete ich zwei Jahre an einer polytechnischen Oberschule in Magdeburg Biologie und Chemie.

Nach meiner Übersiedlung in die Bundesrepublik studierte ich an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen Biochemie, Biologie und Chemie. Meine Studien schloß ich im Februar 1969 mit dem Staatsexamen für das Lehramt an Gymnasien ab. Danach besuchte ich als Studienreferendarin das Studienseminar Tübingen und legte im Februar 1970 die Pädagogische Prüfung für das Lehramt an Gymnasien ab.

Vom April 1970 an arbeitete ich als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Genetik der Ruhr-Universität Bochum und begann mit den Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation "DNA- und RNA-Puffs von *Sciara coprophila*". Diese wurden im Januar 1973 abgeschlossen.

Seit Dezember 1970 bin ich mit Herrn Bernhard Welsch verheiratet.

Vom August 1972 an bin ich hauptamtlich an der Schiller-Schule in Bochum als Studienassessorin tätig, nachdem ich in den davorliegenden zwei Jahren bereits mit geringer Stundenzahl dort unterrichtet hatte.

